

学位論文題名

細菌性スーパー抗原に反応する T 細胞亜群の解析

学位論文内容の要旨

はじめに

スーパー抗原は多数の T 細胞クローンを活性化し、感染免疫において重要な役割を果たす。スーパー抗原は通常の蛋白抗原とは異なる様式で、T 細胞を刺激することが知られているが、これらによって刺激される T 細胞亜群については、T 細胞レセプター (TCR) レパートリーを除いては、不明な点が多い。

本研究では、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) でラベルしたリンパ球を反応細胞として用いる新しい方法を導入することにより、細菌性スーパー抗原である SEB 反応性 T 細胞亜群について解析し、反応細胞の TCR と細胞膜表現形、活性化 T 細胞の産生するサイトカイン、さらに SEB を提示する主要組織適合複合 (MHC) 分子等について、若干の知見を得たので報告する。

方法と結果

SEB 最適濃度を調べた後、反応 T 細胞サブセットを解析するため、種々の濃度の CFSE でラベルした脾細胞を用い、SEB に対する増殖反応をフローサイトメトリーで観察した。CFSE ラベル T 細胞は培養後 1 日目より分裂を開始して CFSE^{low} となり、これら CFSE^{low} ポピュレーションはその後経時的に増加した。培養 4 日目の脾細胞の CFSE 強度をヒストグラムで観察すると、分裂ごとに 1/2 となり、最大で 5 回分裂した細胞が最大ポピュレーションであることが判明した。

次に、精製 CD4⁺ または CD8⁺ T 細胞亜群による抗 SEB 反応を調べるため、脾細胞を MACS を用いて分画し、CFSE でラベル後、SEB で刺激した。CD8⁺ 分画 (CD4⁺)、CD4⁺ 分画 (CD8⁺) いずれも増殖を示し、CD8⁺ 分画と比べ CD4⁺ 分画で有意に多い細胞数が認められた。従って、精製 T 細胞亜群をリスポンダーとしても、CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞いずれも単独で SEB に反応することが明らかになった。しかし、SEB 反応性の V β 8⁺T 細胞中の分裂細胞数では、CD8⁺T 細胞の方が CD4⁺T 細胞より高値を示した。従って、V β 鎖によって、CD4⁺ と CD8⁺ T 細胞の反応性が異なる可能性が示唆された。

マウスでは SEB 反応性 T 細胞は、V β 7, 8 を発現し、SEB と主として MHC クラス II 分子である H-2E との複合分子に結合して反応する。そこで SEB と脾細胞を培養後、増殖している細胞が実際どのような TCR β 鎖を発現しているか、経時的に観察した。回収脾生細胞全体における V β 6 又は V β 8 陽性細胞の割合は培養 1 日目ではほぼ同じであったが、2 日目以降 V β 8⁺T 細胞は増加を始め、4 日目には回収生細胞の 20% を超えた。一方、V β 6⁺T 細胞の割合にはほとんど変化が認められなかった。V β 8⁺T 細胞中の CFSE^{low} 分裂細胞の割合は、培養 3 日目で 80% を超えた。一方

Vβ6⁺T 細胞のうち少数残存のものは分裂し、Vβ6⁺生細胞中の 60% となってプラトーを示した。CD4⁺ と CD8⁺T 細胞亜群においても、Vβ8⁺細胞の分裂細胞の割合が Vβ6⁺細胞のものより高かった。

スーパー抗原に反応後、T 細胞は activation induced cell death (AICD) によって死滅するので、脾細胞を SEB で刺激後経時的 (1-7 日) に、Vβ6⁺, Vβ8⁺亜群中のアポトーシス細胞を Annexin V 染色によって解析した。アポトーシス細胞を比較すると、培養 3 日目では Vβ6⁺T 細胞の 53%, Vβ8⁺T 細胞の 22% が Annexin V 陽性であった。Annexin V 陽性 Vβ8⁺T 細胞は、培養 5 日以降増加したのに対し、Vβ6⁺T 細胞は 2 日目以降高値を持続した。よって、SEB で直接刺激されない Vβ6⁺T 細胞の多くのが、培養開始後早期に死滅するのに対し、SEB 反応性 Vβ8⁺T 細胞は一度活性化し、増殖反応を示した後、AICD によってアポトーシスとなることが判明した。

次に CD4⁺, CD8⁺T 細胞が拘束される MHC 分子が、実際 I-E かどうかを確認するため SEB と培養開始時に抗 I-E 抗体を加え、培養後解析した。抗 I-E 抗体無添加では、CD4⁺ Vβ8⁺, CD8⁺ Vβ8⁺T 細胞いずれも 4 日目に増加を示したが、抗 I-E 抗体添加によって、4 日目における Vβ8⁺T 細胞の割合が減少した。抗 I-E 抗体による Vβ8⁺細胞の割合の減少は、CD4⁺, CD8⁺T 細胞いずれにおいても著明に認められ、Vβ6⁺細胞では減少は見られなかった。培養 2 日目における CD4⁺ Vβ6⁺, CD4⁺ Vβ8⁺, CD8⁺ Vβ6⁺, または CD8⁺ Vβ8⁺各 T 細胞亜群中の分裂細胞の割合を比較すると、抗 I-E 抗体によって、CD4⁺ Vβ8⁺ と CD8⁺ Vβ8⁺T 細胞ポピュレーションにおける分裂増殖は、ほぼ完全に抑制されたが、Vβ6⁺T 細胞に対しては抗 I-E 抗体添加は影響を与えなかった。NK-T 細胞についても分裂を解析したが、Vβ6⁺, Vβ8⁺いずれにおいても、抗 I-E 抗体の有意の影響は認められなかった。従ってこれらの細胞の中で分裂しているものは、SEB 刺激ではなく bystander 効果によると考えられた。

最後に SEB 刺激培養系におけるサイトカイン産生を解析した。脾細胞を SEB (2.5μg/ml) で刺激開始後、経時的に上清中のサイトカインを定量した。IL-2, IL-4 産生は培養 2 日目でピークを示したが、IL-10, IFN-γ は 3 日目にピークが認められた。特に IFN-γ の産生量は 4 日目でも高値を維持し、逆に IL-4 値が急速に低下した。以上の結果は、SEB 刺激によって Th1, Th2 いずれの T 細胞ポピュレーションも活性化される、または Th0 ポピュレーションが活性化されることを示唆した。

考察

今回、CFSE 染色を用いる新たな方法で、SEB 反応性 T 細胞亜群を解析したところ、培養 4 日目で 5 回分裂細胞が最大ポピュレーションを形成すること、CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞いずれも単独で SEB に反応する知見を得た。SEB に直接反応しない Vβ6⁺T 細胞、NK-T 細胞も、一部は bystander 効果により、SEB 刺激培養系で分裂を示した。しかし、SEB で直接刺激されない Vβ6⁺T 細胞の大部分は、培養開始後早期に死滅するのに対し、SEB 反応性 Vβ8⁺T 細胞は CD4, 8 分子の発現に関わらず、SEB+I-E に反応して一度活性化し、増殖した後 AICD によりアポトーシスとなった。また SEB 刺激により、T 細胞では Th1, Th2 いずれの型のサイトカインも産生した。以上より CFSE ラベル反応細胞を用いることにより、分裂やアポトーシス細胞亜群の同定が容易に出来ることが判明した。この方法は生体内でも応用可能なので、免疫反応細胞の詳細な解析には有用と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 大 野 重 昭
副 査 教 授 上 出 利 光

学位論文題名

細菌性スーパー抗原に反応する T 細胞亜群の解析

スーパー抗原は感染免疫において重要な役割を果たし、通常の蛋白抗原とは異なる様式で T 細胞を刺激する。本研究では、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) でラベルしたリンパ球を反応細胞として用いる新しい方法により、細菌性スーパー抗原の SEB 反応性 T 細胞亜群、産生サイトカイン、さらに SEB を提示する主要組織適合複合体 (MHC) 分子等について解析した。

CFSE ラベル T 細胞は培養後 2 日目より分裂を開始して CFSE^{low} となり、これら CFSE^{low} ポピュレーションはその後経時的に増加した。培養 4 日目の CFSE 強度をヒストグラムで観察すると、分裂ごとに CFSE 強度は 1/2 となり、5 回分裂した細胞が最大ポピュレーションであった。

次に、MACS を用いて分画した CD8⁺ 分画、CD4⁺ 分画の SEB 反応性を調べた。その結果、CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞いずれも単独で SEB に反応するが、CD4⁺ T 細胞数が CD8⁺ T 細胞数より多数回収された。しかし、SEB 反応性の Vβ8⁺ T 細胞中の分裂細胞数は、CD8⁺ T 細胞の方が CD4⁺ T 細胞より高値を示した。従って、Vβ鎖によって CD4⁺ と CD8⁺ T 細胞の反応性が異なる可能性が示唆された。

次に、SEB と脾細胞を培養後、増殖細胞の TCRβ鎖発現を経時的に観察した。回収脾生細胞における Vβ6 又は Vβ8 陽性細胞の割合は、培養 1 日目ではほぼ同一であったが、2 日目以降 Vβ8⁺ T 細胞は増加を始め、4 日目には回収細胞の 20% を超えた。一方、Vβ6⁺ T 細胞の割合にはほとんど変化が認められなかった。Vβ8⁺ T 細胞中の分裂細胞の割合は、培養 3 日目で 80% を超えた。一方少数残存の Vβ6⁺ T 細胞の 60% が分裂を示した。

T 細胞の activation induced cell death (AICD) を解析するため、SEB と反応後、経時的に Vβ6⁺、Vβ8⁺ 亜群中のアポトーシス細胞を Annexin V 染色で観察した。培養 3 日目では Vβ6⁺

細胞の 53%, V β 8⁺T 細胞の 22%が Annexin V 陽性であった。Annexin V 陽性 V β 8⁺T 細胞は、培養 5 日以降増加したのに対し、V β 6⁺T 細胞は 2 日目以降高値を持続した。よって、V β 6⁺T 細胞の多くのものが培養開始後早期に死滅し、V β 8⁺T 細胞は増殖反応を示した後、AICD によってアポトーシスとなることが判明した。

SEB と培養開始時に抗 I-E 抗体を加えると、CD4⁺, CD8⁺T 細胞いずれにおいても V β 8⁺細胞の割合が減少したが、V β 6⁺細胞では減少は見られなかった。培養 2 日目における分裂細胞の割合を比較すると、抗 I-E 抗体によって、V β 8⁺T 細胞の分裂はほぼ完全に抑制され、V β 6⁺T 細胞には影響はみられなかった。NK-T 細胞も分裂を示したが、抗 I-E 抗体の影響を受けなかった。従ってこれらの細胞の分裂は、SEB と I-E 分子による刺激ではなく、bystander 効果によると考えられた。

最後に脾細胞を SEB で刺激後、上清中のサイトカインを定量した。IL-2, IL-4 産生は培養 2 日目で、IL-10, IFN- γ は 3 日目にピークを示した。IFN- γ 産生量は 4 日目でも高値を維持し、逆に IL-4 値が急速に低下した。

今回、CFSE 染色を用いる方法で、SEB 反応性 T 細胞の分裂回数を定量できること、CD8⁺, CD4⁺T 細胞いずれも単独で SEB に反応することを明らかにした。また SEB 刺激により、Th1, Th2 型のサイトカインが産生されることが判明した。

発表後、副査の上出教授からスーパー抗原に対する T 細胞反応と、通常の抗原での反応におけるサイトカインパターン等の差について、SEB と MHC との結合部位について、副査の大野教授から、CFSE の特徴と、使用の利点について、CD4 陽性または CD8 陽性 V β 8 陽性 T 細胞の増殖とサイトカインパターンの関係について、抗 I-E 抗体添加培養における NK-T 細胞反応の評価について、臨床応用への可能性について、最後に主査の小野江教授から SEB を *in vivo* で投与後の病態についての質問があった。申請者は大概妥当な解答をなし得た。

この論文は、スーパー抗原による病態修飾の基盤を明らかにした点で高く評価される。また今回用いた方法は生体内でも応用可能なので、今後、免疫反応細胞の詳細な解析には有用と考えられた。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研讃や、取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。